



⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 87402104.1

⑭ Date de dépôt: 21.09.87

⑮ Int. Cl.4: C 12 N 15/00
C 07 H 21/04, C 12 N 5/00,
C 12 N 7/00

⑯ Priorité: 23.09.86 FR 8613272

⑰ Date de publication de la demande:
30.03.88 Bulletin 88/13

⑲ Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑳ Demandeur: TRANSGENE S.A.
16, rue Henri Régnaut
F-92400 Courbevoie (FR)

㉑ Inventeur: Drillien, Robert
10, Boulevard Paul Déroutière
F-67000 Strasbourg (FR)

Spehner, Danièle
29, Rue de la Chénale
F-67200 Eckbolsheim (FR)

㉒ Mandataire: Warcolin, Jacques et al
Cabinet Réglimebaum 26, avenue Kléber
F-75116 Paris (FR)

Le microorganisme a été déposé auprès la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le numéro I 594.

㉓ Séquence d'ADN vecteurs, virus recombinants et procédé mettant en oeuvre des virus de la vaccine recombinants capables de se multiplier dans les cellules CHO.

㉔ Séquence d'ADN isolée du virus du cowpox qui participe à la multiplication de ce virus dans les cellules CHO, vecteurs, virus recombinants et procédé mettant en oeuvre des virus de la vaccine recombinants capables de se multiplier dans les cellules CHO.

Description**SEQUENCE D'ADN, VECTEURS, VIRUS RECOMBINANTS ET PROCEDE METTANT EN OEUVRE DES VIRUS DE LA VACCINE RECOMBINANTS CAPABLES DE SE MULTIPLIER DANS LES CELLULES CHO.**

Le virus de la vaccine est de plus en plus employé comme vecteur d'expression dans des cellules animales depuis la mise au point des méthodes propres à ce système (Panicali et Paoletti, 1982 ; Mackett et al., 1982 ; Smith et al., 1983 ; Panicali et al. ; Kieny et al., 1984). La construction de virus recombinants du virus de la vaccine contenant des gènes qui codent pour des protéines d'intérêt médical ou vétérinaire est particulièrement recherchée. La synthèse de la protéine étrangère dont le gène a été intégré dans le génome du virus de la vaccine peut ensuite être obtenue en culture cellulaire *in vitro* ou après inoculation à un organisme vivant, selon le but poursuivi. Un des avantages du virus de la vaccine et tant que vecteur est sa capacité de se multiplier dans un grand nombre de types cellulaires différents.

Cependant quelques exceptions à cette règle existent et, en particulier, le virus de la vaccine de type sauvage est incapable de se multiplier dans une lignée de cellules d'ovaires de hamster chinolos, CHO (Drillien, Spehner et Kirn, 1978). Or les cellules CHO constituent un des systèmes les plus prometteurs pour la synthèse de protéines dans des cellules de mammifères. En effet ces cellules se cultivent facilement, elles ont un temps de génération court et leur génétique est la mieux maîtrisée de tous les systèmes analogues.

La présente invention concerne la modification du virus de la vaccine par l'intégration dans son génome d'un gène étranger qui lui confère la capacité de se multiplier dans les cellules CHO. Le gène apportant cette nouvelle spécificité d'hôte est dérivé du virus du cowpox (ou variole bovine, virus de la vache apparenté au virus de la vaccine) qui est capable de se multiplier dans les cellules CHO. Les génomes du cowpox et du virus de la vaccine sont très proches particulièrement dans les 100.000 paires de bases de la partie centrale de l'ADN (Mackett et Archard, 1979). Cependant le génome du cowpox est plus grand que celui de la vaccine (environ 230.000 pb au lieu de 190.000) et l'information génétique supplémentaire qu'il contient semble résider essentiellement dans ses extrémités. La similitude entre le génome du virus de la vaccine et celui du cowpox permet d'envisager d'employer le cowpox comme vecteur naturellement adapté aux cellules CHO.

Toutefois, le cowpox se multiplie à un titre dix fois inférieur à celui de la vaccine ce qui risque d'entraîner un rendement plus faible de l'expression d'une protéine produite par un recombinant cowpox en comparaison avec un recombinant vaccine. D'autre part dans la perspective de l'utilisation de recombinants virus pour la vaccination, il faut souligner que l'emploi du virus de la vaccine est bien maîtrisé et a permis à ce jour l'éradication complète de la variole.

La présente invention concerne la mise au point d'un vecteur présentant les avantages connus du virus de

la vaccine et la capacité de se multiplier sur cellules CHO du virus du cowpox.

La présente invention concerne, d'abord, l'identification et la localisation de l'information génétique qui confère au virus du cowpox la capacité de se multiplier dans les cellules CHO.

En effet, les études menées ont permis d'identifier une séquence impliquée dans la multiplication du virus cowpox dans les cellules CHO et qui, transférée dans le virus de la vaccine, assure la multiplication de ce virus dans les cellules CHO.

Ainsi, l'invention concerne une séquence d'ADN isolée notamment du virus du cowpox et qui participe à la multiplication de ce virus dans les cellules CHO et qui comprend la totalité ou une partie fonctionnelle de la séquence représentée dans la figure 6 ou une séquence équivalente fonctionnelle.

Il est possible qu'une partie de ce gène soit suffisante pour assurer la fonction de multiplication, on l'appelle "partie fonctionnelle". Il est également possible que des mutations où des variations ponctuelles ne modifient pas la fonction, on parle alors de "séquence équivalente fonctionnelle".

Bien que l'on préfère que cette séquence d'ADN comporte ses propres signaux de contrôle qui assurent son expression dans les cellules CHO, ceci n'est pas indispensable et l'on peut envisager de la mettre sous le contrôle d'éléments ayant une autre origine.

Comme cela est décrit précédemment, cette séquence d'ADN est plus particulièrement destinée à être intégrée dans le virus de la vaccine pour assurer sa multiplication dans les cellules CHO. Cette intégration s'effectue par recombinaison homologue, il est donc intéressant de prévoir que la séquence d'ADN en cause comportera au moins une région homologue d'une séquence du virus de la vaccine qui pourra participer à ce processus de recombinaison homologue au cours de la multiplication intracellulaire des virus.

En fait, il apparaît que chez le virus cowpox le gène permettant la multiplication dans les cellules CHO est entouré de séquences homologues à des séquences du génome de la vaccine, ce qui permet de simplifier la préparation d'un vecteur plasmidique de recombinaison.

Comme cela est déjà connu pour le virus de la vaccine, il est possible d'insérer dans la séquence d'ADN, objet de l'invention, un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel sous la dépendance d'éléments de contrôle assurant son expression dans les cellules hôtes. Cette technologie a déjà été décrite, notamment dans les brevets suivants : 84.06499, 84.07959, 85.09225 et peut être utilisée avec éventuellement certaines adaptations et avantages. En particulier, dans les contractions précédentes, la sélection des virus recombinants était effectuée en insérant le gène à exprimer dans le gène TK de la vaccine, ce qui a pour conséquence

de rendre le virus recombinant TK- et de permettre la sélection par le procédé connu.

Dans le cas présent, il n'est pas indispensable d'effectuer une insertion dans le gène TK car, dans la mesure où le gène codant pour la protéine d'intérêt industriel est lié au gène assurant la multiplication dans les cellules CHO, seuls les virus recombinants peuvent se multiplier sur cellules CHO, ce qui autorise une sélection "naturelle" des virus recombinants.

Dans ce dernier cas, il est préférable que le bloc d'ADN comprenant les gènes à recombiner soit flanqué de séquences homologues de séquences du virus de la vaccine afin qu'ils restent liés lors de la recombinaison.

La présente invention concerne également les cellules CHO infectées par un virus de la vaccine recombinant incorporant une séquence d'ADN telle que décrite précédemment et, en particulier, un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel, ainsi que les virus correspondants.

L'invention concerne également les vecteurs plasmidiques incorporant une séquence d'ADN telle que décrite précédemment, ces vecteurs étant utilisables pour effectuer la recombinaison *in vivo*.

L'invention concerne également des cellules CHO ayant intégré une séquence d'ADN selon la présente invention et capables d'assurer la multiplication du virus de la vaccine dans ces cellules.

Enfin, l'invention concerne la préparation de protéines d'intérêt industriel par culture de cellules CHO infectées par un virus recombinant selon l'invention.

Les exemples ci-après sont destinés à illustrer d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

Exemple 1 Identification de la région du génome du virus du cowpox qui permet la multiplication dans les cellules CHO.

Des recombinants entre le virus de la vaccine et le cowpox ont été sélectionnés après infection mixte de cellules d'embryons de poulet avec chacun des virus. L'analyse de l'ADN des recombinants montre que la capacité de se multiplier dans des cellules CHO est associée à la conservation des sites de restriction de l'extrémité gauche du génome du cowpox.

Des cellules primaires d'embryon de poulet, préparées à partir d'oeufs embryonnés de 11 à 12 jours, sont infectées simultanément avec un mutant thermosensible du virus vaccinal, tsN7 (Drillien *et al.*, 1982) et le cowpox (souche Brighton) à raison de 2 unités formant plage (ufp) par cellule. Parallèlement d'autres tapis cellulaires sont infectés avec chacun de ces virus. Après une heure d'adsorption l'excès de virus non adsorbé est éliminé et du milieu frais est ajouté aux cellules.

Celles-ci sont incubées à 33°C pendant un à deux jours jusqu'à la nécrose totale de la couche cellulaire. Les cellules infectées sont alors congelées puis décongelées et le virus issu de l'infection est titré à 39,5°C sur cellules d'embryon de poulet, sous une couche de milieu contenant 1% d'agar noble. Après deux jours à 39,5°C un plus grand

nombre de plages de virus s'est formé sur les tapis cellulaires infectés avec le mélange des 2 virus que sur les tapis témoins (ni le mutant thermosensible du virus de la vaccine ni le cowpox ne donnent un nombre significatif de plages) ; les plages qui apparaissent à partir de l'infection mixte peuvent donc correspondre à des recombinants entre le cowpox et le virus de la vaccine.

Les plages de recombinants potentiels sont reprises individuellement et le virus qu'elles contiennent est amplifié par multiplication sur cellules d'embryon de poulet. Leur ADN est ensuite purifié, coupé par des enzymes de restriction puis analysé sur gel d'agarose.

Les profils de restriction permettent de déduire que chaque plage correspond effectivement à un recombinant entre l'ADN du virus de la vaccine et l'ADN du cowpox. Grâce aux cartes de restriction connues pour les virus parentaux (Mackett and Archard 1978, Drillien and Spelner 1983) il est possible de reconnaître l'origine de la plupart des fragments des recombinants et de dresser leurs cartes de restriction (figure 1).

On voit que les recombinants dénommés 4, 6, 14, 15 et 19 qui sont capables de se multiplier dans des cellules CHO ont conservé les sites caractéristiques de l'extrémité gauche du génome du cowpox. Les autres recombinants dénommés 2, 7, 11, 16 et 18 qui sont incapables de se multiplier dans des cellules CHO ne possèdent que partiellement ou pas du tout ces sites de l'extrémité gauche du génome du cowpox.

Il ressort de ces résultats que la conservation des sites de restriction de l'extrémité gauche du génome du cowpox est associée au phénotype de multiplication sur cellules CHO.

Exemple 2 Isolement et analyse du génome de recombinants du virus de la vaccine ayant intégré un fragment d'ADN du cowpox.

Pour mieux préciser la localisation de l'information génétique utile, des recombinants capables de se multiplier sur cellules CHO ont été sélectionnés après infection avec le virus de la vaccine et transfection avec des fragments d'ADN du cowpox.

Les fragments de restriction utiles à l'analyse de la partie importante, c'est-à-dire l'extrémité gauche des 2 virus sont représentés dans la figure 2 ; c'est dans cette partie du génome que l'on peut soupçonner qu'interviennent les événements de recombinaison décrits dans l'exemple 1.

Des cellules primaires d'embryon de poulet sont infectées avec le mutant tsN7 du virus de la vaccine (Drillien *et al.*, 1982) à raison de 0,1 ufp par cellule et transfectées avec un mélange d'ADN intact de la souche sauvage du virus de la vaccine (souche Copenhagen) et de l'ADN du cowpox (souche Brighton) préalablement digérés avec l'enzyme HindIII. Des témoins de transfection sans ADN ou avec seulement l'ADN du virus de la vaccine sont réalisés. Après 48 heures d'incubation à 39,5°C les cellules sont congelées, décongelées puis le virus ainsi libéré est titré sur une monocouche de cellules CHO qui sont ensuite recouvertes de milieu contenant 1% d'agar.

Les échantillons provenant de cellules transférées avec l'ADN du cowpox donnent de nombreuses plaques de lyse sur cellules CHO tandis que les échantillons témoins n'en donnent aucune.

Les plaques visibles sur cellules CHO sont reprises individuellement et le virus qu'elles contiennent est amplifié sur cellules d'embryon de poulet. Leur ADN est ensuite extrait et analysé en comparaison avec l'ADN des 2 souches parentales de vaccine et de cowpox. Après digestion par l'enzyme EcoRI, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose puis ils sont transférés à un filtre de nitrocellulose et hybridés au fragment Sall-K du virus de la vaccine marqué radioactivement au ³²P.

Après lavage de la nitrocellulose pour enlever la radioactivité fixée de manière aspécifique une autoradiographie est réalisée. L'autoradiographie (figure 3) montre que les recombinants du virus de la vaccine ayant intégré un fragment du cowpox ont perdu le fragment EcoRI-C typique du virus de la vaccine et comportent un fragment EcoRI qui s'hybride avec le fragment radioactif Sall-K de la vaccine ; ce fragment est intermédiaire en taille entre le fragment EcoRI-A du cowpox et le fragment EcoRI-C du virus de la vaccine.

Ce nouveau fragment EcoRI hybride cowpox-vaccine, présent dans tous les recombinants, provient d'une double recombinaison entre le fragment EcoRI-A du cowpox et le fragment EcoRI-C de la vaccine et doit renfermer l'information nécessaire pour la multiplication dans des cellules CHO. Pour que cette recombinaison ait pu se produire il fallait que l'information permettant la multiplication sur cellules CHO soit entourée de part et d'autre par des séquences du génome du cowpox homologues à des séquences du génome vaccine.

Exemple 3 Construction d'un plasmide recombinant portant la région du génome du cowpox qui permet la multiplication dans des cellules CHO.

Afin d'isoler l'information génétique permettant la multiplication dans des cellules CHO le fragment EcoRI-A de l'un des recombinants décrits dans l'exemple 2 a été cloné dans le plasmide bactérien pAT153 (Twigg et Sherratt, 1980).

L'ADN d'un des recombinants décrits dans l'exemple 2 est purifié puis coupé avec l'enzyme EcoRI. Le fragment EcoRI-A est éluté d'un gel d'agarose puis inséré dans le plasmide pAT153 préalablement soumis à l'action d'EcoRI. Des bactéries HB101 sont transformées avec le mélange de ligation puis l'ADN des colonies obtenues est transféré sur nitrocellulose et hybridé au fragment Sall-K du virus de la vaccine. Les colonies positives à l'hybridation sont amplifiées et l'ADN plasmidique qu'elles contiennent est purifié. Deux plasmides ont été retenus : pEA1 et pEA2, qui correspondent à l'insertion du fragment EcoRI-A dans les deux orientations opposées dans le vecteur pAT153.

Pour vérifier que ces plasmides portent l'information génétique permettant la multiplication du virus sur cellules CHO on provoque une recombinaison entre l'insert d'ADN du plasmide et un virus de la vaccine : des cellules d'embryons de poulets sont

infectées avec le mutant thermosensible du virus de la vaccine tsN7 à raison de 0,1 ufp par cellule puis transférées avec l'ADN du virus de la vaccine sauvage et avec l'ADN du plasmide pEA1 ou pEA2.

5 Des témoins sans ADN du virus de la vaccine ou sans plasmide sont également réalisés. Après 48 heures d'incubation à 39,5°C, les cellules sont congelées puis décongelées et le virus issu de l'infection est titré sur cellules CHO. Seuls les échantillons provenant de cellules transférées avec l'ADN du virus de la vaccine et les plasmides pEA1 ou pEA2 donnent des plaques sur cellules CHO.

Exemple 4 Sous-clonage de fragments de plus petite taille du pEA1 dans un plasmide vecteur destiné à la recombinaison avec le virus de la vaccine.

Pour affiner la localisation de l'information génétique qui permettant la multiplication dans des cellules CHO, des fragments de restriction recouvrant des portions réduites du plasmide pEA1 ont été clonés dans un plasmide portant le gène thymidine kinase (TK) du virus de la vaccine : pTG186poly.

25 - Construction de pTG186poly :
Le fragment HindIII (Hin-J) du génome du virus de la vaccine (VV) contient le gène complet de la thymidine kinase (TK) qui a déjà été utilisé précédemment pour permettre l'échange et la recombinaison d'un fragment d'ADN étranger dans le génome de VV (Mackett et al., 1982).

Il est important de noter que le transfert d'un insert dans le gène TK du génome de VV crée un virus TK déficient ce qui facilite sa sélection.

35 Il a tout d'abord été nécessaire de produire un plasmide de petite taille portant un site unique HindIII utilisable pour l'intégration du fragment Hin-J de VV. En outre, il était nécessaire d'éliminer les sites de restriction non nécessaires du plasmide, de façon à permettre les manipulations ultérieures.

40 La construction a été amorcée à partir du plasmide pML2 (Lusky et Botchan, 1991) qui est un vecteur dérivé du plasmide pBR322 dans lequel le segment compris entre les nucléotides 1089 et 2491 a été perdu par déletion spontanée. D'abord la séquence de PstI a été éliminée par insertion du fragment AhaIII-AhaIII de pUC8 (Vieira et Messing, 1982) entre deux sites AhaIII de pML2 en éliminant 19 paires de bases.

50 On a utilisé la méthode du "linker-tailing" (Lathe et al., 1984) pour insérer un adaptateur HindIII entre les sites NruI et EcoRI traité par S1 de ce plasmide, en éliminant le site BamHI. Ceci conduit à un plasmide de 2049 paires de bases portant le gène β -lactamase fonctionnel (conférant la résistance à l'ampicilline) et comportant en outre une origine de réplication active dans *E. coli* et un site de restriction unique HindIII. Cette construction a été appelée pTG1H.

55 Le fragment Hin-J de l'ADN de VV portant le gène TK a préalablement été cloné dans le vecteur pAT153 (Drillen et Spehner, 1983). Ce fragment de 4,6 kb a été recloné dans le site HindIII de pTG1H. Un clone a été sélectionné dans lequel le gène TK est situé distalement par rapport au gène codant pour la résistance à l'ampicilline. Cette construction a été

appelée pTG1H-TK.

La construction pTG1H-TK a été utilisée comme vecteur pour les constructions suivantes.

L'étape suivante a été d'isoler un promoteur de VV utilisable pour commander l'expression du gène étranger à intégrer dans VV. Le promoteur d'un gène précoce codant pour une protéine de 7500 daltons (7,5 K) a déjà été utilisé avec succès dans un but identique (Smith et al., 1983) et on a donc procédé à l'isolement de ce segment.

Le gène 7,5 K est situé sur l'un des plus petits fragments Sall (fragment Sal-S) du génome de VV type WR (Venkatasan et al., 1981). Comme les petits fragments sont clonés de façon préférentielle, une grande proportion des clones obtenus par clonage direct de l'ADN de VV type WR coupé par Sall dans le plasmide pBR322 porte le fragment Sal-S. Ce fragment est transféré sur le bactériophage vecteur M13mp701 (Kieny et al., 1983), par digestion Sal et religation, ce qui donne le phage M13.TG.Sal-S.

Dans ce clone, un site Scal se trouve immédiatement à proximité de l'ATG d'initiation du gène 7,5 K. En aval du gène 7,5 K se trouvent situés des sites uniques BamHI et EcoRI provenant du vecteur. Les sites BamHI et Scal sont fusionnés par l'intermédiaire d'un adaptateur BgIII : 5'-CAGATCTG-3' après avoir complété les extrémités générées par digestion BamHI avec le fragment Klenow de la polymérase de *E. coli*. Ce procédé élimine le site Scal mais reconstitue le site BamHI et déplace le site unique EcoRI en aval. En même temps, le site Sall (AccI) en aval est éliminé et le site Sall en amont devient donc unique. Cette construction est appelée M13.TG.7,5K.

A l'intérieur du fragment Hin-J de l'ADN de VV se trouvent situés des sites Clal et EcoRI qui sont séparés par environ 30 paires de bases (Weir et Moss, 1983). Le fragment promoteur de 7,5 K présent dans M13.TG.7,5K est excisé par AccI et EcoRI et cloné entre les sites Clal et EcoRI de pTG1-H-TK pour générer pTG1H-TK-P7,5K.

Dans cette construction les sites BamHI et EcoRI uniques du vecteur M13 se retrouvent immédiatement en aval de la séquence du promoteur 7,5 K. Ces sites uniques BamHI et EcoRI seront utilisés dans la construction suivante.

Le segment polylinker du bactériophage M13TG131 (Kieny et al., 1983) est excisé par EcoRI et BgIII et inséré entre les sites EcoRI et BamHI du plasmide pTG1H-TK-P7,5K, générant le pTG186poly. Dans cette construction, 5 sites de restriction uniques sont disponibles pour le clonage d'un gène étranger sous le contrôle du promoteur P7,5K : PstI, BamHI, SstI, SmaI et EcoRI.

- Insertion de fragments du pEA1 dans pTG186poly :

Le fragment EcoRI-A du plasmide pEA1 a été digéré par différents enzymes et des fragments de différentes tailles ont été insérés dans le pTG186poly.

Les plasmides recombinants dérivés de pTG186poly et contenant des portions du fragment EcoRI-A du plasmide recombinant pEA1 sont représentés dans la figure 4.

La coupure du plasmide pEA1 avec l'enzyme BgIII

donne plusieurs fragments. Le plus grand des fragments BgIII a été inséré dans le site BamHI du vecteur pTG186poly pour donner les plasmides pEA5a et pEA5b qui se distinguent par l'orientation de l'insertion.

Le plasmide pEA6 est dérivé du plasmide pEA5 par coupure de ce dernier avec l'enzyme Clal et recircuclarisation du plus grand fragment ce qui a pour effet de déléter le petit fragment BgIII-PstI du plasmide pEA5.

Le plasmide pEA7 provient de pEA6 après coupure de ce dernier avec l'enzyme Clal et recircuclarisation du grand fragment obtenu ce qui donne une déletion du petit fragment Clal.

Le plasmide pEA8 provient de pEA6 après coupure de ce dernier par SphI puis recircuclarisation du grand fragment ce qui donne une déletion du fragment SphI-BgIII de droite.

Le plasmide pEA9 provient du plasmide pEA5b après coupure de ce dernier par SphI puis religation ce qui donne une déletion du fragment gauche SphI-BgIII.

Le plasmide pEA36 a été construit en deux étapes. D'abord le petit fragment HpaI a été isolé du plasmide pEA9 et il a été inséré dans le site SmaI du vecteur M13-130. Puis le fragment HpaI a été sorti du vecteur M13-130 grâce aux sites EcoRI et PstI et il a été intégré dans les sites EcoRI et PstI du vecteur pTG186poly.

30 Chacun de ces plasmides a été utilisé dans une expérience de transfection de manière à transférer l'insertion qui se trouve dans le gène TK porté par le plasmide au génome du virus de la vaccine, selon la méthode décrite dans l'exemple 3.

35 Les plasmides capables de conférer la capacité de multiplication dans des cellules CHO au virus de la vaccine sont pEA1, 2, 5a, 5b, 6, 9, 36.

Le plus petit fragment ayant cette propriété est porté par le plasmide pEA36. Il comprend 2004 paires de bases.

Exemple 5 Séquençage du gène permettant la multiplication du virus de la vaccine dans les cellules CHO.

45 L'ADN du cowpox porté par le plasmide pEA36 et situé entre les sites HpaI a été entièrement séquencé selon la méthode des didéoxynucléotides (Sanger et al. 1980) après insertion des plus petits fragments dans les phages M13-130 et M13-131 (Kieny et al. 1983) en suivant la stratégie schématisée dans la figure 5.

Le cadre de lecture pouvant coder pour une protéine de 77.000 daltons débute aux nucléotides ATG et se termine aux nucléotides TAA représentés sur la carte de la figure 5. Les flèches en-dessous de la carte indiquent l'endroit où commence la lecture de chaque clone, la longueur de la lecture et sa direction. Lorsque le début de lecture ne commence pas à un site de restriction, des amarques constituées d'oligonucléotides synthétiques déduits d'une séquence partielle ont été utilisées.

La séquence complète du gène ainsi que la séquence de la protéine de 77.000 daltons pour laquelle il peut coder est présentée dans la figure 6.

Exemple 6 Recombinaison homologue et intégration du gène du cowpox dans l'ADN de la vaccine, en dehors du gène TK.

Parmi les virus recombinants, décrits dans l'exemple 4, capables de se multiplier sur cellules CHO, on constate que certains sont TK+ et d'autres TK-.

Par exemple dans le transfection des cellules avec le plasmide pEA9, sur 27 plages de virus recombinants sélectionnées pour leur multiplication sur CHO, 16 étaient TK- et 11 TK+.

La recombinaison introduisant l'information qui permet la multiplication dans des cellules CHO s'est donc produite dans une région différente de celle du gène qui code pour la thymidine kinase.

Ce résultat implique la possibilité de sélection pour l'insertion d'un gène étranger dans une région du génome autre que le gène TK, simultanément à la sélection pour la multiplication sur cellules CHO. Il suffit pour cela de juxtaposer le gène choisi et le gène permettant la croissance sur cellules CHO. L'insertion de ce dernier par recombinaison homologue avec le génome du virus de la vaccine entraînera la co-intégration du gène étranger.

Dépôt de souche représentative de l'invention.

La souche de *E. coli* 1106 portant le plasmide pEA36 a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes sous le n° I 594, le 2 septembre 1986.

Le plasmide pEA36 porte un fragment d'ADN de 2.004 pb du virus du Cowpox qui permet la multiplication du virus dans les cellules CHO ; ce fragment d'ADN est destiné à la recombinaison in vivo avec le virus de la vaccine (qui ne se multiplie pas dans les cellules CHO). Par transfection des cellules avec l'ADN plasmidique et co-infection avec le virus de la vaccine, on pourra sélectionner des virus recombinants de la vaccine qui ont acquis la capacité de se multiplier sur cellules CHO.

REFERENCES

- Drillien, R., Spehner, D. & Kirn, A. J. *Virol.* 28, 843-850 (1978).
- Drillien, R., Spehner, D. & Kirn, A. *Virology* 119, 372-381 (1982).
- Drillien, R. & Spehner, D. *Virology* 131, 385-393 (1983).
- Kierny, M.P., Lathe, R. & Lecocq, J.-P. *Gene* 26, 91-99 (1983).
- Kierny, M.P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H. & Lecocq, J.-P. *Nature* 312, 163-166 (1984).
- Lathe, R., Kierny, M.P., Schmitt, D., Curtis, P. and Lecocq, J.-P. *J. Molec. Appl. Genet.* 2, 331-342 (1984).
- Lusky & Botchon *Nature* 293, 79-81 (1981).
- Mackett, M. & Archard, L.C. (1979) *J. Gen. Virol.* 45, 683-701 (1979).
- Mackett, M., Smith, G.L. & Moss, B. *P.N.A.S. (USA)* 79, 7415-7419 (1982).
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. "Molecular Cloning : A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982).
- Moss, B. In "Virology" (B.N. Fields, ed.) pp. 685-703.

Raven Press, New York.

Panicali, D. & Paoletti, E. *P.N.A.S. (USA)* 79, 4927-4931 (1982).

Panicali, D., Davis, S.W., Weinberg, R.L. & Paoletti, E. *P.N.A.S. (USA)* 80, 5364-5368 (1983).

Sanger, F.S., Nicklen, S. and Coulson, A.R. *P.N.A.S. (USA)* 74, 5463-5467 (1977).

Smith, G.L., Mackett, M. & Moss, B. *Nature* 302, 490-495 (1983).

Smith, G.L., Murphy, B.R. & Moss, B. *P.N.A.S. (USA)* 80, 7155-7159 (1983).

Twigg, A.J. & Sherratt, D. *Nature* 283, 216-218 (1980).

Venkatasan, S., Baroudy, B.M. & Moss, B. *Cell* 25, 805-813 (1981).

Viera and Messing *Gene* 19, 259-268 (1982).

Weir, J.P. & Moss, B. *J. Virol.* 46, 530-537 (1983).

Légende des figures

Figure 1 Cartes de restriction de l'ADN de recombinants entre le virus de la vaccine et le cowpox.

Les quatre lignes horizontales supérieures représentent les cartes de restriction du virus de la vaccine (VV) et du cowpox (CP) obtenues après coupure avec les enzymes HindIII et XbaI. Les dix lignes horizontales suivantes représentent les génomes des recombinants isolés selon l'exemple 1 entre le VV et le CP. Les sites de restriction notés avec une flèche sont des sites caractéristiques du génome du cowpox ; ceux notés avec un trait vertical sont caractéristiques du génome du virus de la vaccine. Les sites communs aux deux génomes ne sont pas notés. Les pointillés indiquent des régions d'incertitude dans la détermination.

Figure 2 Cartes de restriction de l'extrémité gauche des virus de la vaccine (VV) et du cowpox (CP) après coupure avec les enzymes EcoRI, HindIII et SalI.

Les fragments sont notés conventionnellement A, B, C ..., par ordre de taille décroissant.

Figure 3 Caractérisation des profils de restriction de l'ADN des recombinants entre le virus de la vaccine et le cowpox.

L'ADN du virus de la vaccine (VV), du cowpox (CP) et de quatre recombinants appelés rec2, rec3, rec4 et rec6, isolés selon l'exemple 2, a été préparé à partie de cellules d'embryon de poulet infectées en présence de thymidine ³H. La partie A de la figure présente une autoradiographie des fragments obtenus après digestion de l'ADN avec EcoRI, séparation des fragments sur gel d'agarose et autoradiographie du gel sec pendant quinze jours d'exposition. En B, l'ADN traité de la même manière qu'en A a été transféré sur nitrocellulose et hybridé à une sonde SalI-1 portée par le plasmide pAT153.

Figure 4 Plasmides recombinants contenant des portions du fragment EcoRI du plasmide pEA1 intégrés dans le vecteur pTG186poly.

Les deux lignes horizontales supérieures représentent l'extrémité gauche de l'ADN du virus de la vaccine et du cowpox avec les sites de restriction

pour l'enzyme EcoRI. La troisième ligne est une représentation linéaire du plasmide pEA1 avec le fragment EcoRI-A en trait continu et le plasmide pAT153 en trait discontinu.

Les lignes suivantes sont des représentations linéaires des différents plasmides recombinants avec le fragment dérivé de pEA1 en trait continu et le vecteur pTG186poly en traits discontinus ; le promoteur du gène 7.5 K est symbolisé par une flèche ouverte qui donne le sens de la transcription.

Les sites de restriction sont symbolisés par les lettres suivantes :

B	BglI
C	ClaI
E	EcoRI
H	HpaI
P	PstI
S	SalI
Sp	SphI
X	XbaI

Figure 5 Stratégie de séquençage du gène permettant la multiplication dans des cellules CHO.

La ligne horizontale en trait gras représente le fragment d'ADN séquencé et compris entre les sites HpaI (H1). Les autres sites de restriction sont symbolisés par les lettres suivantes S (Sau3A), H2 (Hpa2), X (XbaI), C (ClaI), Xb (XbaI). Le cadre de lecture pouvant coder pour une protéine de 80.000 daltons débute aux nucléotides ATG et se termine aux nucléotides TAA portés sur la carte. Les flèches en-dessous de la carte indiquent l'endroit où commence la lecture de chaque clone, la longueur de la lecture et sa direction.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

protéine d'intérêt industriel est placé sous des signaux de contrôle de poxvirus, assurant son expression dans les cellules CHO.

6. Séquence d'ADN selon l'une des revendications 4 et 5, caractérisée en ce que les extrémités de cette séquence comportent des régions homologues de régions de virus de la vaccine pouvant assurer une recombinaison.

7. Vecteur plasmidique comportant une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 6.

8. Virus recombinant de la vaccine comportant une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 6.

9. Cellules CHO infectées par un virus recombinant de la vaccine selon la revendication 8.

10. Procédé de préparation d'une protéine d'intérêt industriel caractérisé en ce qu'on cultive des cellules CHO selon la revendication 9 infectées par un virus recombinant de la vaccine comportant un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel, ledit gène étant sous le contrôle d'éléments assurant son expression dans les cellules CHO.

11. Cellules CHO transformées ayant intégré une séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 6.

12. Cellules CHO selon la revendication 11, caractérisées en ce qu'elles permettent la multiplication du virus de la vaccine.

Figure 6 Séquence du gène permettant la multiplication dans les cellules CHO.

Revendications

1. Séquence d'ADN isolée notamment du virus du cowpox et qui participe à la multiplication de ce virus dans les cellules CHO, et qui comprend la totalité ou une partie fonctionnelle de la séquence représentée dans la figure 6 ou une séquence équivalente fonctionnelle.

2. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre ses propres signaux de contrôle qui assurent son expression dans les cellules CHO.

3. Séquences d'ADN selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une région homologue d'une région du virus de la vaccine qui peut participer à un processus de recombinaison homologue au cours de la multiplication intracellulaire des virus.

4. Séquence d'ADN selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle comporte, en outre, un gène codant pour une protéine d'intérêt industriel.

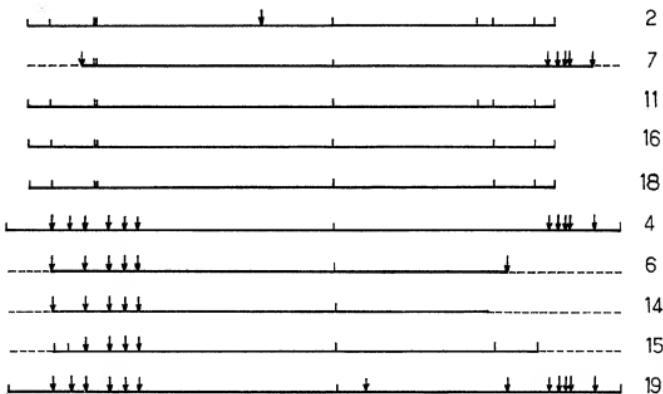
5. Séquence d'ADN selon la revendication 4, caractérisée en ce que le gène codant pour une

0262043

M
C N K F, E O I, G L J H, D, A, B
VV
HIND II

D, C P O P G, F O M J N N S K, E, A, I, B, L, H, CP

H, J, F, A, G K I M D, L, B, C, E, H, VV
D, J, I, F, B, G N K P, C, M H, A, L, O, E, CP
XHO I



FIG_1

0262043

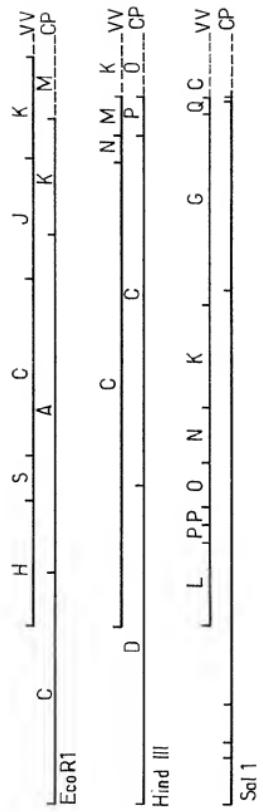


FIG-2

1Kb

0262043

A

VV *CP* *rec2* *rec3* *rec4* *rec6*

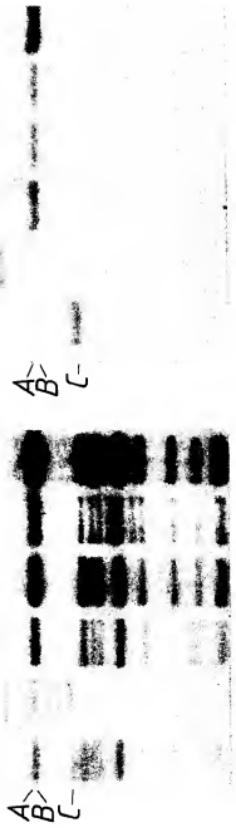
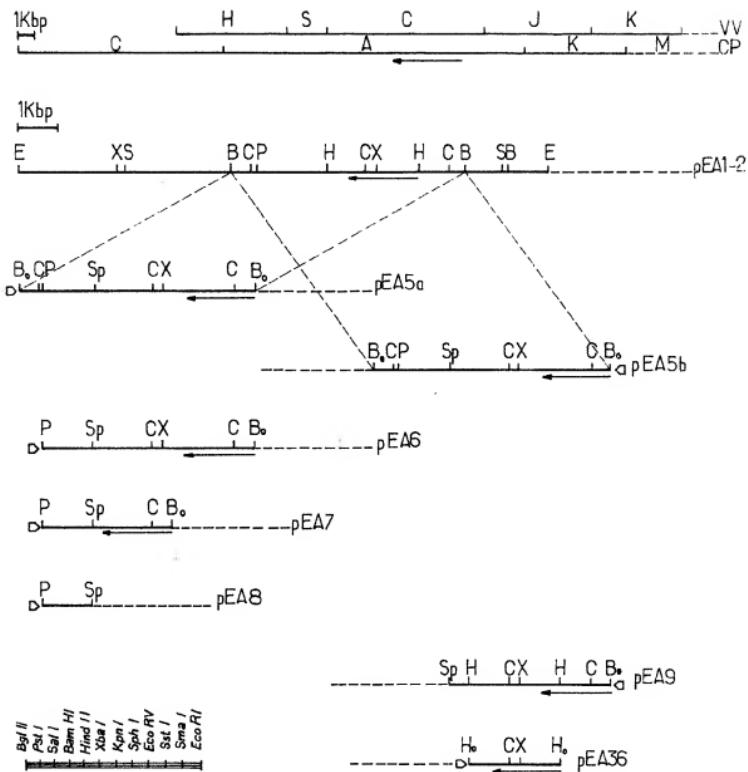


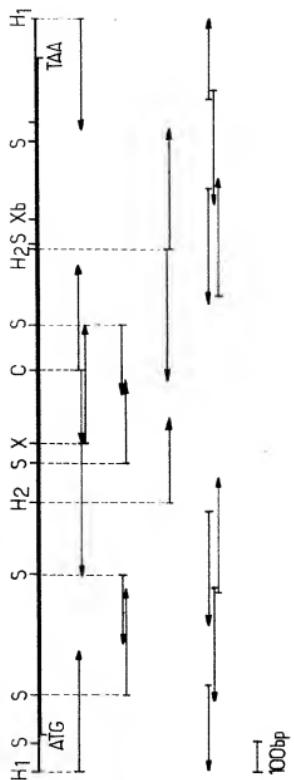
FIG. 3

0262043



FIG_4

0262043



FIG_5

676 TTA ACG GAG GTG TAA ACT CTG GAG TTA ATA AAA TTT AAA CAC TAA ATT ATT TAA TAA TIG TAC AAG TTT TIG ATC TGG TAT
 677
 678 AAA TAC ATT CAA AAA TGA TAA TTT ATT GAC ATT TGT GCG GGT GTA TAG AAT TCA CAG TAG CTC ATT CAC TTC TAT TCA GTC AAA ATG
 679 Met
 680
 681 TTT GAT TAT CTG GAA AAT GAG GAG GTG GCT CTC GAT GAA CTT AAA CAG ATG TIG AGA GAT CCT AAT GAT ACC AGG AAC CAA TTC
 682 Cys Asn Ala Leu His Ala Tyr Leu Phe Asn Glu His Cys Asn Asn Val Glu Val Val Lys Leu Asp Ser Gly Thr Asn Pro
 683 Phe Asp Tyr Leu Glu Asn Glu Glu Val Ala Leu Asp Glu Leu Lys Glu Met Leu Arg Asp Arg Asp Pro Asn Asp Thr Arg Asn Glu Phe
 684
 685 AAG ATT ATT GCT CTA CAT GCA TAC CTT TIC ATT GAG CAC TGT ATT ATT GAT GTC AAA CTA CTA GAC AGT GGT ACT ATT CCA
 686 Lys Asn Asn Ala Leu His Ala Tyr Leu Phe Asn Glu His Cys Asn Asn Val Glu Val Val Lys Leu Asp Ser Gly Thr Asn Pro
 687
 688 TTA AAT TGG AGA CAG CTT ACT CCA TTA GGG GAA TAC ACA ATT ATT AGA CAT ATT GAT ATT AAG GAT ATT GCG ATT ATT CTA
 689 Leu His Lys Asn Trp Arg Glu Leu Thr Pro Leu Glu Glu Tyr Thr Asn Ser Arg His Glu Lys Val Asn Lys Asp Ile Ala Met Val Leu
 690
 691 CAC AAA AAT TGG AGA CAG CTT ACT CCA TTA GGG GAA TAC ACA ATT ATT AGA CAT ATT GAT ATT AAG GAT ATT GCG ATT ATT CTA
 692 Leu Glu Ala Thr Glu Tyr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Asn Ile Phe Thr Tyr Met Lys Ser Lys Asn Val Asp Leu Ile Lys Val
 693
 694 CTC CAA GAA GCT ACT GGA TAT AGC AAC ATG ATT GAC TTT ATT ATA TTC ACC ATT ATT GAA TAT ATT GAC TTS ATA AAG GAA
 695 Leu Glu Ala Thr Glu Tyr Ser Asn Ile Asn Asp Phe Asn Ile Phe Thr Tyr Met Lys Ser Lys Asn Val Asp Leu Ile Lys Val

FIG. 6

0262043

TTG GAA CAT GGA TTT GAT TTT AGT GTT AAA TGC GAA AAA CAT CAT TCA GTC GAA AAT TAT GTC GAA GAT GAT CCT GCT GTC
Leu Val Glu His Glu Phe Asp Phe Ser Val Ile Glu His Ser Val Ile Glu Asn Tyr Val Met Thr Asp Asp Pro Val Pro 600
630
GAA AAT ATT GAT TTA TTC ATA GAA AAT GGA TGC AGT GTT ATT TAT GAG GAC GAG GAT GAT GAG TAC GCG TAT GAA GAA TAT CAC
Glu Ile Ile Asp Leu Phe Ile Glu Asn Glu Cys Ser Val Ile Tyr Glu Asp Glu Asp Asp Glu Tyr Glu Tyr Ala Tyr Glu Tyr His 660
690
TCA CAA AAT GAC GAT TAT CAA CCA GAA AAT TGC GGT ACA GTA TTA CAT CTG TAT ATC TCT CAT CTC GAG TCG GAT TCG AGA 720
Ser Glu Asn Asp Asp Tyr Glu Pro Arg Asn Cys Glu Tyr Thr Val Leu His Leu Tyr Ile Ile Ser His Leu Tyr Ser Asp Ser Arg 750
780
B40 810 840 870 900
TCA TCT GTC AAC CGG GAA GTC GGT ATT ATT GAT GGA ATC AAC CCA TCT TCT ATA GAT AAA AAC TAT TGT ACA GCT CTT CAA
Ser Cys Val Asn Pro Glu Val Val Lys Cys Leu Ile Asn His Glu Ile Asp Ser Ile Asp Lys Asn Tyr Cys Thr Ala Leu Glu 930
960
TAT TAT ATT AAG TCA TCT CAT ATA GAT ATA GAC ATC ATT AAA TTG TTA ATG AAA GGA ATA GAT AAC AGC GCT TAT TCA TAT ATA GAC GAT 990
Tyr Tyr Ile Lys Ser Ser His Ile Asp Ile Asp Ile Val Lys Leu Met Lys Glu Ile Asp Asn Thr Ala Tyr Ser Tyr Ile Asp Asp
Leu Thr Cys Cys Thr Arg Glu Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu 1020
1050
CTA ACA TGT TGT ACT CCA GGA ATT ATG GCT GAT TAT CTA AAT AGT GAT TAT AGA TAC AAA GAT GTC GAT TGG GTC AAA TGG 1080
Leu Thr Cys Cys Thr Arg Glu Ile Met Ala Asp Tyr Leu Asn Ser Asp Tyr Arg Tyr Asn Lys Asp Val Asp Leu Asp Leu Val Lys Leu

FIG. 6

1110 TTT TTG GAG AAT GGA AAA CGG CAC GGA ATA ATG TGT AGT ATT GAA CCA CTA TGG AGA AAT GAT AAG GAA AEC AAC TCT TGT ATA TGG AAA
 Phe Leu Glu Asn Gly Lys Pro His Glu Ile Met Cys Ser Ile Val Pro Leu Trp Arg Asn Asp Lys Glu Thr Ile Ser Leu Ile Leu Lys
 1140
 1200 ACA ATG AAC TCG GAT BTC CTC CAA CAT ATA CTA ATT GAG TAT ATA AGA TTC AGC BAT ATC BAT ATC TCT CTA GTG GAA TAC ATG TGT GAA
 Thr Met Asn Ser Asp Val Leu Glu His Ile Leu Ile Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Asp Ile Ser Asp Ile Ser Val Glu Tyr Met Leu Glu
 1230
 1290 TAT GGA GCT GTG GTA AAT AAA GAG GCT ATT GAC GGA TAC TTT AAA AAT ATT GAT TCT TAC AGC ATG AAA TAT CTA CTA AAA ARG
 Tyr Glu Ala Val Val Asn Lys Glu Ala Ile His Glu Tyr Phe Lys Asn Ile Asn Ile Asp Ser Tyr Thr Met Lys Tyr Leu Leu Lys
 1320
 1360 GAA GGG GGA GAT GCG GTC ART CAT CTC GAT GAA GAG BAT GAT GGA CAC ATT GGA CAC TAT GAA CST TAT ATT TTC TAC
 Glu Glu Glu Asp Ala Val Asn His Leu Asp Asp Glu Ile Pro Ile Glu His Leu Cys Lys Ser Asn Tyr Glu Arg Tyr Asn Phe Tyr
 1410
 1470 ACT GAT ACA TAC AGA CAG GGT TTT CGT GAT ATG TCT TAT GCT TGC CCA ATT CTT AGT ACT ATA AAC ATT TGC CTA CCT TAT CTT AAA GAC
 Thr Asp Thr Tyr Arg Glu Glu Phe Arg Asp Met Ser Tyr Ala Cys Pro Ile Leu Ser Thr Ile Asn Ile Cys Leu Pro Tyr Leu Lys Asp
 1500
 1560 ATT AAC ATG ATT GAC AAA CCA GGA GAA CCA CTT CTT CAC AGG GCT GTT AGA TAT AAA CAA TCT CTA GTG TCT TTA CGG CTA GAA TCC
 Ile Asn Met Ile Asp Lys Arg Glu Glu Thr Leu Leu His Lys Ala Val Arg Tyr Asn Lys Glu Ser Leu Val Ser Leu Leu Glu Ser
 1620
 1680 GGT TCA GAT GTC AAC ATT AGA TCA ATT AAC GGA TAT AGA TGT ATA GCG ATT GCA ATC GAA TCT AGA AAC ATT GAA CTG CTG AAC ATG
 Glu Ser Asp Val Asn Ile Arg Ser Asn Asn Glu Tyr Thr Cys Ile Ala Ile Asn Glu Ser Arg Asn Ile Glu Leu Leu Asn Met

FIG-6

0262043

FIG. 6



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS												
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)									
A	EP-A-0 162 782 (TRANSGENE S.A.) * Page 2, ligne 23 - page 3, ligne 4; page 37, ligne 4 - page 38, ligne 23; figure 7; revendications * & FR-A-84 06 499 (Cat. D)	1-12	C 12 N 15/00 C 07 H 21/04 C 12 N 5/00 C 12 N 7/00									
A	--- EP-A-0 110 385 (UNITED STATES OF AMERICA) * Page 2, ligne 13 - page 3, ligne 22; page 5, ligne 25 - page 6, ligne 7; revendications *	1										
A	--- EXPERIENTIA, vol. 38, no. 3, mars 1982, pages 285-297, Birkhäuser Verlag, Basel, CH; R. WITTEK: "Organization and expression of the poxvirus genome" * Paragraphes 2.5,4; figures 4,7 *	1	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)									
A	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 10, no. 18, 1982, pages 5673-5679, IRL Press Ltd, Oxford, GB; B.M. BAROUDY et al.: "Sequence homologies of diverse length tandem repetitions near ends of vaccinia virus genome suggest unequal crossing over" * Résumé; page 5679, lignes 1-8 *	1	C 12 N									

<p>Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Lieu de la recherche LA HAYE</td> <td style="width: 33%;">Date d'achèvement de la recherche 11-11-1987</td> <td style="width: 33%;">Examinateur YEATS S.M.</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> & : membre de la même famille, document correspondant </td> </tr> </table> </td> </tr> </table>				Lieu de la recherche LA HAYE	Date d'achèvement de la recherche 11-11-1987	Examinateur YEATS S.M.	CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> & : membre de la même famille, document correspondant </td> </tr> </table>			X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	& : membre de la même famille, document correspondant
Lieu de la recherche LA HAYE	Date d'achèvement de la recherche 11-11-1987	Examinateur YEATS S.M.										
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons </td> <td style="width: 33%; vertical-align: top;"> & : membre de la même famille, document correspondant </td> </tr> </table>			X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	& : membre de la même famille, document correspondant							
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire	T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons	& : membre de la même famille, document correspondant										